



19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

12 Offenlegungsschrift
10 DE 100 43 992 A 1

51 Int. Cl. 7:
G 02 B 21/00

21 Aktenzeichen: 100 43 992.6
22 Anmeldetag: 5. 9. 2000
43 Offenlegungstag: 21. 3. 2002

DE 100 43 992 A 1

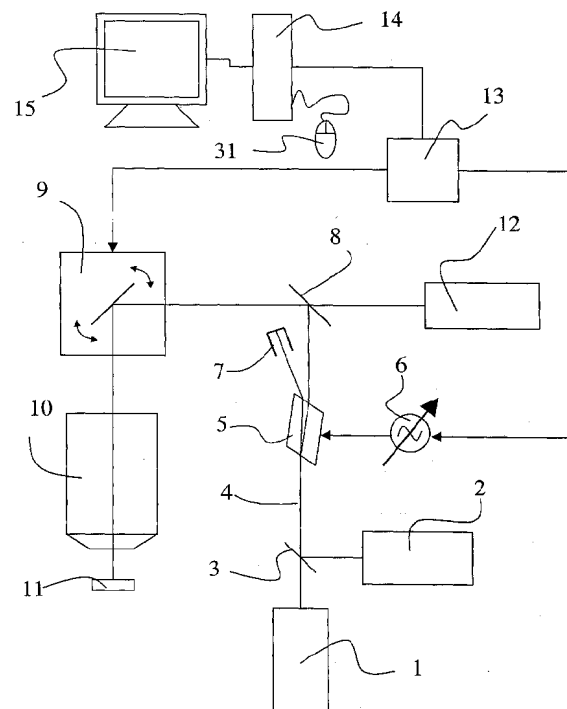
71 Anmelder:
Leica Microsystems Heidelberg GmbH, 68165
Mannheim, DE
74 Vertreter:
Ullrich & Naumann, 69115 Heidelberg

72 Erfinder:
Engelhardt, Johann, Dr., 76669 Bad Schönborn, DE;
Hoffmann, Jürgen, Dr., 65191 Wiesbaden, DE;
Knebel, Werner, Dr., 76709 Kronau, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

54 Verfahren zur Untersuchung einer Probe und konfokales Scan-Mikroskop

57 Ein Verfahren zur Untersuchung einer Probe (11) mittels eines konfokalen Scan-Mikroskops mit mindestens einer Lichtquelle (1), vorzugsweise einem Laser, zur Erzeugung eines Beleuchtungslichtstrahls (4) für die Probe (11) und einer Strahlableitvorrichtung (9) zur Führung des Beleuchtungslichtstrahls (4) über die Probe (11) weist im Hinblick auf eine sichere Festlegung interessierender Details oder Bereiche der Probe (11) die folgenden Verfahrensschritte auf: Zunächst erfolgt ein Aufnehmen eines Voransichtsbilds. Anschließend wird mindestens ein interessierender Bereich im Voransichtsbild markiert. Dann erfolgt ein Zuordnen individueller Beleuchtungslichtstrahl-Wellenlängen und/oder Beleuchtungslichtstrahl-Leistungen zu dem Bereich oder den Bereichen. Anschließend erfolgt ein Beleuchten des Bereichs oder der Bereiche der Probe (11) gemäß der Zuordnung. Schließlich wird das von der Probe (11) ausgehenden Reflexions- und/oder Fluoreszenzlicht detektiert. Des weiteren ist ein konfokales Scan-Mikroskop mit mindestens einer Lichtquelle (1), vorzugsweise einem Laser, zur Erzeugung eines Beleuchtungslichtstrahls (4) für eine Probe (11) und einer Strahlableitvorrichtung (9) zur Führung des Beleuchtungslichtstrahls (4) über die Probe (11) angegeben, wobei Mittel zum Aufnehmen eines Voransichtsbilds und Mittel zum Markieren mindestens eines interessierenden Bereichs im Voransichtsbild vorgesehen sind, wobei dem Bereich oder den Bereichen individuelle ...



DE 100 43 992 A 1

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Untersuchung einer Probe mittels eines konfokalen Scan-Mikroskops mit mindestens einer Lichtquelle, vorzugsweise einem Laser, zur Erzeugung eines Beleuchtungslichtstrahls für die Probe und einer Strahlableitvorrichtung zur Führung des Beleuchtungslichtstrahls über die Probe.

[0002] Des weiteren betrifft die vorliegende Erfindung ein konfokales Scan-Mikroskop mit mindestens einer Lichtquelle, vorzugsweise einem Laser, zur Erzeugung eines Beleuchtungslichtstrahls für eine Probe und einer Strahlableitvorrichtung zur Führung des Beleuchtungslichtstrahls über die Probe.

[0003] Ein Verfahren zur Untersuchung einer Probe mittels eines Scan-Mikroskops und ein konfokales Scan-Mikroskop der eingangs genannten Arten sind aus der Praxis bekannt. In der bekannten Scan-Mikroskopie wird eine Probe mit einem Beleuchtungslichtstrahl für die Probe beleuchtet, um das von der Probe emittierte Reflexions- oder Fluoreszenzlicht zu beobachten. Der Fokus des Beleuchtungslichtstrahls wird im Allgemeinen durch Verkippen zweier Spiegel in einer Probenebene bewegt, wobei die Ablenkachsen meist senkrecht aufeinander stehen, so dass ein Spiegel in X- und der andere in Y-Richtung ablenkt. Die Verkipfung der die Strahlableitvorrichtung im Wesentlichen bildenden Spiegel wird beispielsweise mit Hilfe von Galvanometer-Stellelementen bewerkstelligt, wobei sowohl schnelle resonante als auch langsamere und genauere nichtresonante Galvanometer zum Einsatz kommen. Die Leistung des von der Probe kommenden Lichts wird in Abhängigkeit von der Position des Abtaststrahls bzw. Beleuchtungslichtstrahls gemessen.

[0004] Speziell in der konfokalen Scan-Mikroskopie wird eine Probe mit dem Fokus eines Beleuchtungslichtstrahls in drei Dimensionen abgetastet. Ein konfokales Rastermikroskop umfasst im Allgemeinen eine Lichtquelle, eine Fokussieroptik, mit der das Licht der Lichtquelle auf eine Lochblende fokussiert wird, einen Strahlteiler, eine Strahlableitvorrichtung zur Strahlsteuerung, eine Mikroskopoptik, eine Detektionsblende und Detektoren zum Nachweis des Detektions- bzw. Fluoreszenzlichts. Das Beleuchtungslicht bzw. der Beleuchtungslichtstrahl wird meist über einen Strahlteiler eingekoppelt. Das von der Probe kommende Fluoreszenz- oder Reflexionslicht gelangt in der meist üblichen Descan-Anordnung über dieselben Scanspiegel bzw. über dieselbe Strahlableitvorrichtung zurück zum Strahlteiler und passiert diesen, um anschließend auf die Detektionsblende fokussiert zu werden, hinter der sich die Detektoren, meist Photomultiplier, befinden. Detektionslicht, das nicht direkt aus der Fokusregion stammt, nimmt einen anderen Lichtweg und passiert die Detektionsblende nicht, so dass man eine Punktinformation erhält, die durch sequentielles Abtasten der Probe zu einem dreidimensionalen Bild führt. Meist wird ein dreidimensionales Bild durch schichtweise Bilddatennahme erzielt.

[0005] Proben werden derzeit meist über das gesamte Scan-Feld hinweg mit Licht einer Wellenlänge oder simultan mit Licht mehrerer Wellenlängen beleuchtet. Aus diesem Grund werden Vergleichsuntersuchungen, die darauf abzielen, Proben unter unterschiedlichen spektralen Beleuchtungsbedingungen, jedoch unter sonst identischen Randbedingungen, zu untersuchen, sequentiell an einer Probe oder sequentiell an gleich präparierten Proben durchgeführt.

[0006] Bei Untersuchungen, die auf dem Fluoreszenz-Resonanz-Energy-Transfer (FRET) beruhen, werden Moleküle optisch, beispielsweise mit Licht von 488 nm Wellenlänge,

angeregt. Das Emissionslicht dieser sogenannten Donatormoleküle, das im Beispielfall eine Wellenlänge von ca. 543 nm aufweisen würde, führt über den sogenannten Förstertransfer zur Anregung eng benachbarter Akzeptormoleküle. Diese emittieren dann Licht von ca. 570 nm Wellenlänge. Zur Kontrolle der Probenaufbereitung bei Experimenten, die auf Fluoreszenz-Resonanz-Energy-Transfer (FRET) beruhen, werden derzeit vor der Durchführung der eigentlichen Untersuchungen Testmessungen durchgeführt. Im Beispielfall würde man zunächst Licht mit einer Wellenlänge von 543 nm einstrahlen, um die Akzeptormoleküle direkt anzuregen und um bei der Detektionslichtwellenlänge von 570 nm ein Bild aufzunehmen. Anschließend würde man die Probe mechanisch, beispielsweise mit einem x-y-Tisch, verfahren und an anderer Stelle die "eigentliche" Untersuchung mit Anregungslicht von 488 nm Wellenlänge durchführen.

[0007] Um Direktanregung des Akzeptors mit dem Licht, das eigentlich zur Anregung des Donators gedacht ist – im Beispiel 488 nm –, auszuschließen, kann man das Bleichverhalten von Akzeptor und Donator in Direktanregung messen. Aus dem Vergleich der Bleichkoeffizienten bei Direktanregung mit denen bei FRET-Anregung kann auf den Grad der Direktanregung geschlossen werden.

[0008] Im Idealfall müsste die Bahn des abgelenkten Beleuchtungslichtstrahls auf der Probenoberfläche oder bei einer konfokalen Anordnung in einer Schichtebene in der Probe einen Mäander beschreiben. Dabei erfolgt zunächst ein Abtasten einer Zeile in X-Richtung bei konstanter Y-Position, anschließend eine Y-Verschiebung bei angehaltener X-Position und nachfolgend bei konstanter Y-Position ein Abfahren einer Zeile in negativer X-Richtung. In der Realität kann eine derartige Mäanderform aufgrund der Massenträgheit der bewegten Galvanometerbauteile und der Spiegel der Strahlableitvorrichtung nur für geringe Scanraten annähernd erreicht werden. Tatsächlich beschreibt die Scanbahn des Beleuchtungslichtstrahls bei sinnvollen Scanraten von mehr als 100 Hz eine sinusähnliche Kurve, was eine Korrektur der sich daraus ergebenden Abweichungen vom Idealfall erforderlich werden lässt. So ist beispielsweise die Bahngeschwindigkeit in der Nähe der Umkehrpunkte niedriger als im linearen Sinusbereich, was unter anderem zu verstärktem Bleichen in diesen Bereichen führt. Es ist daher seit langem üblich, während des Durchlaufens der Umkehrteilstücke die Probenbeleuchtung mit Hilfe von mechanischen, das Bildfeld eingrenzenden Blenden oder durch geeignete optische Anordnungen – beispielsweise mit akustooptischen Modulatoren (AOTF) – zu unterbrechen. Diese Technik der Strahlunterbrechung während des Scannens wird Blanking genannt. Eine Anordnung mit mechanischen Blenden wurde bereits 1990 in einem konfokalen Laser-Scan-Mikroskop der Anmelderin eingebaut. Eine Anordnung mit einem akustooptischen Modulator ist in "Scientific and Technical Information Vol. XI, No. pp. 1, 9–19, Juni 1995, Leica TCS 4D UV – The system concept for Multiparameter Confocal Microscopy" beschrieben. In dieser Schrift werden die sinusähnliche Bahnkurve und die damit verbundenen Probleme erklärt, wobei das Blanking jedoch nicht explizit erwähnt wird. Ein kontrolliertes Ausbleichen beliebiger vorbestimmbarer Probenbereiche mit Hilfe einer AOTF-Anordnung, die es ermöglicht, verschiedene Bereiche einer Probe mit unterschiedlicher Lichtintensität zu beleuchten, ist in P. Wedekind et al. "Scanning microphotolysis: a new photobleaching technique based on fast intensity modulation of a scanned laser beam and confocal imaging", Journal of Microscopy, Vol. 176, Pt 1, October 1994, pp 23–33" beschrieben. Diese Schrift illustriert eine Blanking-Technik auf sehr hohem technischem Niveau.

[0009] Die Offenlegungsschrift DE 198 29 981 "Verfahren und Anordnung zur konfokalen Mikroskopie", Carl Zeiss Jena GmbH, beschreibt die Vermeidung des Bleichproblems und zusätzlich die Vermeidung des Durchblutens dadurch, dass die spektrale Zusammensetzung und/oder die Intensität des in den Mikroskopstrahlengang eingekoppelten Laserlichts verändert wird, während die Ablenkung ununterbrochen fortgesetzt wird, wodurch mindestens zwei nebeneinanderliegende Orte bzw. Rasterpunkte der Probe mit Licht unterschiedlicher Spektraleigenschaften und/oder unterschiedlicher Intensität beaufschlagt werden.

[0010] Bei dem bekannten Verfahren und bei dem bekannten konfokalen Scan-Mikroskop ist problematisch, dass nicht klar ist, wie ein auszuwertendes Detail einer Probe für eine differenzierte Beleuchtung auswählbar ist. Somit ist eine sichere Auswahl und Festlegung der interessierenden Details der Probe nicht möglich.

[0011] Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Untersuchung einer Probe und ein konfokales Scan-Mikroskop bereitzustellen, wonach eine sichere Definierung interessierender Details einer Probe für eine differenzierte Beleuchtung auf einfache Weise ermöglicht ist.

[0012] Erfindungsgemäß ist die voranstehende Aufgabe durch ein Verfahren zur Untersuchung einer Probe mit den Merkmalen des Patentanspruchs 1 gelöst. Demnach weist das Verfahren die folgenden Verfahrensschritte auf: Zunächst erfolgt ein Aufnehmen eines Voransichtsbilds. Hierdurch wird eine bildhafte Darstellung der zu untersuchenden Probe für den Beobachter geliefert. Anschließend erfolgt ein Markieren mindestens eines interessierenden Bereichs im Voransichtsbild. Durch diese beiden Verfahrensschritte ist in erfindungsgemäßer Weise eine besonders einfache Auswahl und Festlegung eines interessierenden Details einer Probe ermöglicht. Der Beobachter muß lediglich das Voransichtsbild studieren, um dann eine Markierung im Voransichtsbild vorzunehmen.

[0013] Anschließend erfolgt ein Zuordnen individueller Beleuchtungslichtstrahl-Wellenlängen und/oder Beleuchtungslichtstrahl-Leistungen zu dem Bereich oder den Bereichen. Anschließend wird der Bereich oder werden die Bereiche der Probe gemäß der Zuordnung beleuchtet, worauf eine Detektion des von der Probe ausgehenden Reflexions- und/oder Fluoreszenzlichts erfolgt. Hiermit ist das Untersuchungsverfahren vervollständigt. Dabei können ganz individuell ausgewählte Bereiche beleuchtet werden.

[0014] Bei einer vorteilhaften Ausgestaltung des Verfahrens könnte der Beleuchtungslichtstrahl zur Vermeidung einer unerwünschten Belichtung der Probe außerhalb des zu untersuchenden Bereichs oder der zu untersuchenden Bereiche derart geführt werden, dass im Wesentlichen nur der markierte Bereich oder die markierten Bereiche der Probe beleuchtet werden. Der Beleuchtungslichtstrahl könnte dabei den kürzesten Weg zu dem ausgewählten Bereich oder den ausgewählten Bereichen oder zwischen den ausgewählten Bereichen überstreichen.

[0015] In besonders vorteilhafter Weise könnte das Verfahren bei Untersuchungen angewendet werden, die auf Fluoreszenz-Resonanz-Energy-Transfer (FRET) beruhen. Hierdurch kann die Präparationskontrolle vereinfacht werden. Im Konkreten könnte in einem Bereich eine Kontrollmessung mit Licht der Akzeptormolekül-Anregungswellenlänge durchgeführt werden, während quasi gleichzeitig in einem anderen Bereich eine FRET-Messung mit der Donator-Anregungswellenlänge durchgeführt wird. Die Akzeptormolekül-Anregungswellenlänge könnte beispielsweise 543 nm betragen, während die Donator-Anregungswellenlänge 488 nm betragen könnte.

[0016] Im Konkreten könnte in zwei Bereichen quasi gleichzeitig der jeweilige Bleichkoeffizient ermittelt werden. Dies ist insbesondere bei zeitkritischen Experimenten mit lebenden Proben von Interesse.

[0017] Des weiteren könnte das Maß der Direktanregung des Akzeptors mit Anregungslicht für den Donator durch Messung der Fluoreszenzphotonenausbeute bei gleichzeitigem Ausbleichen des Akzeptors mit Licht der Akzeptormolekül-Anregungswellenlänge ermittelt werden.

[0018] Denkbar ist auch, bei einer ersten Kontrollmessung mit der Akzeptormolekül-Anregungswellenlänge die Lage der Akzeptormoleküle festzustellen und zu speichern, um anschließend ausschließlich an diesen Orten mit Licht der Donator-Anregungswellenlänge zu beleuchten. Der Rest des Bilds könnte dann unbeleuchtet bleiben oder mit einer anderen Lichtwellenlänge beobachtet werden.

[0019] Sowohl in einer zweidimensionalen X-Y-Darstellung als auch in einer dreidimensionalen X-Y-Z-Darstellung könnte man den interessierenden Bereich oder die interessierenden Bereiche der Probe über einen Rechner und vorzugsweise eine Computermouse auswählen oder markieren.

[0020] Über einen derartigen Rechner könnte dann auch das Zuordnen individueller Beleuchtungslichtstrahl-Wellenlängen und/oder Beleuchtungslichtstrahl-Leistungen zu dem Bereich oder den Bereichen erfolgen.

[0021] Zur Vermeidung des Beleuchtens der Probe außerhalb des Bereichs oder der Bereiche könnte ein vorgebbares Blanking durchgeführt werden. Hierbei wird der Beleuchtungslichtstrahl während des Scannens gezielt unterbrochen, so dass die nicht markierten Bereiche gar nicht beleuchtet werden. Hierdurch wird oder werden der Bereich oder die Bereiche besonders hervorgehoben und der nicht markierte Restbereich der Probe nicht unnötig ausgeblendet.

[0022] Zur Erzielung eines höheren Kontrasts und zur Verringerung der Gesamtdatennahmezeit könnte oder könnten der Bereich oder die Bereiche im Vergleich zur verbleibenden Probe langsamer und mit erhöhter Photonenstatistik abgetastet werden.

[0023] Die Probe könnte außerhalb des Bereichs oder der Bereiche oder zwischen den Bereichen mit maximaler Ablenkgeschwindigkeit abgetastet werden. Eine weitere Reduktion der Gesamtdatennahmezeit könnte dadurch erreicht werden, dass die Strahlablenkung außerhalb des Bereichs oder der Bereiche oder zwischen den Bereichen von der sinus-, sägezahn- oder mäanderförmigen Strahlablenkung abweicht. Hierdurch könnten die Bereiche auf einem kürzeren Weg angefahren werden. Im Idealfall könnte die Strahlablenkung zwischen zwei oder den Bereichen im Wesentlichen in direkter Linie von einem Bereich zu einem anderen Bereich erfolgen.

[0024] Im Hinblick auf ein konfokales Scan-Mikroskop ist die obige Aufgabe durch ein konfokales Scan-Mikroskop mit den Merkmalen des Patentanspruchs 14 gelöst. Danach ist das konfokale Scan-Mikroskop der eingangs genannten Art durch Mittel zum Aufnehmen eines Voransichtsbilds und Mittel zum Markieren mindestens eines interessierenden Bereichs im Voransichtsbild gekennzeichnet, wobei dem Bereich oder den Bereichen individuelle Beleuchtungslichtstrahl-Wellenlängen und/oder Beleuchtungslichtstrahl-Leistungen zuordenbar und der Bereich oder die Bereiche der Probe gemäß der Zuordnung beleuchtbar sind.

[0025] Im Konkreten könnte das konfokale Scan-Mikroskop ein spektral selektives Element zur Einstellung der Beleuchtungslichtstrahl-Wellenlänge oder -Wellenlängen aufweisen. Das spektral selektive Element könnte ein AOTF – ein akustooptischer einstellbarer Filter –, ein AOD – ein akustooptischer Deflektor –, ein EOM – ein elektrooptischer Modulator – oder ein mechanisches Bauteil sein. Akustoopt-

tische einstellbare Filter zeichnen sich durch hohe Flexibilität aus und ermöglichen es, die Beleuchtungslichtstrahl-Wellenlänge sehr schnell, d. h. im Bereich von μs , umzuschalten, Licht einer oder mehrerer Wellenlängen zuzuschalten oder die Lichtleistung zu variieren.

[0026] Ein derartiges spektral selektives Element könnte über einen Rechner, vorzugsweise in Abhängigkeit von der Ablenkposition, steuerbar sein.

[0027] Des weiteren könnte das konfokale Scan-Mikroskop ein Element zur Einstellung der Beleuchtungslichtstrahl-Leistung aufweisen. Ein derartiges Element zur Einstellung der Beleuchtungslichtstrahl-Leistung könnte einen AOTF oder ein mechanisches Bauteil aufweisen. Auch das Element zur Einstellung der Beleuchtungslichtstrahl-Leistung könnte über einen Rechner, vorzugsweise in Abhängigkeit von der Ablenkposition, steuerbar sein.

[0028] In besonders einfacher Weise könnte dasselbe Element zur Einstellung der Beleuchtungslichtstrahl-Wellenlänge oder -Wellenlängen und zur Einstellung der Beleuchtungslichtstrahl-Leistung verwendbar sein. Hierbei kommt insbesondere ein AOTF in Frage.

[0029] Zur Bereitstellung mehrerer unterschiedlicher Beleuchtungslichtstrahl-Wellenlängen könnten mehrere Laser zur Erzeugung des Beleuchtungslichtstrahls vorgesehen sein. Alternativ könnten auch ein oder mehrere Mehrlinienlaser zur Erzeugung des Beleuchtungslichtstrahls vorgesehen sein.

[0030] Zur Darstellung und Markierung des Bereichs oder der Bereiche könnte ein PC verwendbar sein, auf dessen Monitor das Bild oder Voransichtsbild der Probe angezeigt wird.

[0031] Die Markierung eines dreidimensionalen Bereichs oder dreidimensionaler Bereiche könnte in einer x,y,z-Darstellung oder in zweidimensionalen Schnittdarstellungen durchführbar sein.

[0032] Die Strahlableitvorrichtung könnte in besonders einfacher Weise Galvanometerstellelemente aufweisen. Derartige Galvanometerstellelemente könnten vorzugsweise mit Hilfe eines Rechners steuerbar sein, mit dem die Strahlableit-Geschwindigkeiten individuell an Erfordernisse bezüglich des markierten Bereichs oder der markierten Bereiche anpassbar sind.

[0033] Es gibt nun verschiedene Möglichkeiten, die Lehre der vorliegenden Erfindung in vorteilhafter Weise auszugestalten und weiterzubilden. Dazu ist einerseits auf die nachgeordneten Ansprüche, andererseits auf die nachfolgende Erläuterung eines Ausführungsbeispiels der Erfindung anhand der Zeichnung zu verweisen. In Verbindung mit der Erläuterung des bevorzugten Ausführungsbeispiels der Erfindung anhand der Zeichnung werden auch im Allgemeinen bevorzugte Ausgestaltungen und Weiterbildungen der Lehre erläutert. In der Zeichnung zeigen

[0034] Fig. 1 in einer schematischen Darstellung das Ausführungsbeispiel eines erfindungsgemäßen konfokalen Scan-Mikroskops,

[0035] Fig. 2 in einer schematischen Darstellung zwei mittels eines Monitors dargestellte markierte zweidimensionale Bereiche,

[0036] Fig. 3 in einer schematischen Darstellung die markierten Bereiche gemäß Fig. 2 mit einer sinusförmigen Abtastbahn des Beleuchtungslichtstrahls für die Probe,

[0037] Fig. 4 in einer schematischen Darstellung die markierten Bereiche gemäß Fig. 2, wobei die Bereiche spezifisch abgetastet werden, und

[0038] Fig. 5 in einer schematischen Darstellung zwei mittels eines Monitors dargestellte markierte dreidimensionale Bereiche.

[0039] Fig. 1 zeigt in einer schematischen Darstellung das

Ausführungsbeispiel eines erfindungsgemäßen konfokalen Scan-Mikroskops zur Untersuchung einer Probe 11. Das konfokale Scan-Mikroskop weist eine Lichtquelle 1 in Form eines ersten Lasers auf. Das Scan-Mikroskop weist des weiteren einen zweiten Laser 2 in Form eines Multilinelasers auf. Die durch den ersten und den zweiten Laser 2 erzeugten Lichtstrahlen werden mittels eines Strahlvereinigers 3 zur Bildung des Beleuchtungslichtstrahls 4 vereinigt.

[0040] Der Beleuchtungslichtstrahl 4 durchläuft einen AOTF 5, der mittels einer AOTF-Hochfrequenz-Ansteuerung 6 betrieben wird. An den AOTF 5 schließt sich eine Strahlfalle 7 an. Das durch den AOTF 5 ausgewählte Beleuchtungslicht wird mittels eines Hauptstrahlteilers 8 auf eine Strahlableitvorrichtung 9 reflektiert. An die Strahlableitvorrichtung 9 schließt sich ein Objektiv 10 an, das das Beleuchtungslicht auf die Probe 11 leitet.

[0041] Des weiteren ist ein Detektor 12 für Fluoreszenz- bzw. Reflexionslicht vorgesehen.

[0042] Zur Steuerung der AOTF-Hochfrequenz-Ansteuerung 6 und der Strahlableitvorrichtung 9 ist ein Steuerungsrechner 13 vorgesehen. Der Steuerungsrechner 13 ist mit einem PC 14 und einem Monitor 15 gekoppelt. Hierdurch sind eine Darstellung der Probe 11 und eine Markierung der interessierenden Bereiche mittels einer Computermouse 31 ermöglicht.

[0043] Fig. 2 zeigt in einer schematischen Darstellung zwei mittels des Monitors 15 dargestellte markierte zweidimensionale Bereiche 16 und 17. Die Bereiche 16 und 17 sind mit Licht unterschiedlicher Wellenlänge zu beleuchten. Zur Markierung der Bereiche 16 und 17 ist ein Mauszeiger 18 vorgesehen, der über das Voransichtsbild 19 führbar ist. Durch Drücken einer Maustaste während des Umfahrens der Bereiche 16 und 17 wird eine für den Benutzer sichtbare Umrandungslinie gezogen.

[0044] Fig. 3 zeigt in einer schematischen Darstellung Probenbereiche 24 und 25, die den markierten Bereichen 17 und 16 gemäß Fig. 2 entsprechen, wobei das Scanfeld 20 entlang einer Scanbahn 23 sinusförmig abgetastet wird. Der Probenbereich 25 wird einer Beleuchtung 21 mit der Wellenlänge λ_1 unterworfen, wohingegen der Probenbereich 24 einer Beleuchtung 22 mit der Wellenlänge λ_2 unterworfen wird.

[0045] Fig. 4 zeigt in einer schematischen Darstellung die Probenbereiche 24 und 25, wobei die Bereiche 24 und 25 spezifisch abgetastet werden. Hierzu ist eine bereichsangepasste Scanbahn 26 erzeugt. Die Strahlableitung erfolgt zwischen den Bereichen 24 und 25 im Wesentlichen auf direktem Weg, was ein Bleichen von Probenbereichen außerhalb der Bereiche 24 und 25 verhindert und die Totzeit zwischen dem Abtasten der Probenbereiche 24 und 25 reduziert. Darüber hinaus kann zusätzlich der Beleuchtungslichtstrahl nach der Abtastung des Bereichs 24 mit Hilfe des AOTF 5 unterbrochen werden, bis die Abtastung des Bereichs 25 beginnt.

[0046] Fig. 5 zeigt in einer schematischen Darstellung zwei mittels des Monitors 15 dargestellte markierte dreidimensionale Bereiche 27 und 28. Des weiteren ist ein Mauszeiger 29 zur Bereichsmarkierung gezeigt. Hierdurch ist ein dreidimensionales Voransichtsbild 30 gebildet. Auch hier sollen die Probenbereiche 27 und 28 mit Licht unterschiedlicher Wellenlänge und/oder unterschiedlicher Intensität beleuchtet werden.

[0047] Hinsichtlich weiterer vorteilhafter Ausgestaltungen des erfindungsgemäßen Verfahrens bzw. des erfindungsgemäßen konfokalen Scan-Mikroskops wird zur Vermeidung von Wiederholungen auf den allgemeinen Teil der Beschreibung sowie auf die beigelegten Patentansprüche verwiesen.

[0048] Schließlich sei ausdrücklich darauf hingewiesen, dass das voranstehend beschriebene Ausführungsbeispiel des erfindungsgemäßen konfokalen Scan-Mikroskops lediglich zur Erörterung der beanspruchten Lehre dient, diese jedoch nicht auf das Ausführungsbeispiel einschränkt.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Untersuchung einer Probe (11) mittels eines konfokalen Scan-Mikroskops mit mindestens einer Lichtquelle (1), vorzugsweise einem Laser, zur Erzeugung eines Beleuchtungslichtstrahls (4) für die Probe (11) und einer Strahlablenkeinrichtung (9) zur Führung des Beleuchtungslichtstrahls (4) über die Probe (11), mit den folgenden Verfahrensschritten:
 - Aufnehmen eines Voransichtsbilds (19, 30);
 - Markieren mindestens eines interessierenden Bereichs (16, 17; 27, 28) im Voransichtsbild (19, 30);
 - Zuordnen individueller Beleuchtungslichtstrahl-Wellenlängen und/oder Beleuchtungslichtstrahl-Leistungen zu dem Bereich (16, 17; 27, 28) oder den Bereichen (16, 17; 27, 28);
 - Beleuchten des Bereichs (24, 25) oder der Bereiche (24, 25) der Probe (11) gemäß der Zuordnung;
 - Detektieren des von der Probe (11) ausgehenden Reflexions- und/oder Fluoreszenzlichts.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Beleuchtungslichtstrahl (4) derart geführt wird, dass im Wesentlichen nur der markierte Bereich (24, 25) oder die markierten Bereiche (24, 25) der Probe (11) beleuchtet werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass es bei Untersuchungen angewendet wird, die auf Fluoreszenz-Resonanz-Energy-Transfer (FRET) beruhen.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass in einem Bereich eine Kontrollmessung mit Licht der Akzeptormolekül-Anregungswellenlänge durchgeführt wird, während quasi gleichzeitig in einem anderen Bereich eine FRET-Messung mit der Donator-Anregungswellenlänge durchgeführt wird.
5. Verfahren nach Anspruch 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, dass in zwei Bereichen quasi gleichzeitig der jeweilige Bleichkoeffizient ermittelt wird.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Maß der Direktanregung des Akzeptors mit Anregungslicht für den Donator durch Messung der Fluoreszenzphotonenausbeute bei gleichzeitigem Ausbleichen des Akzeptors mit Licht der Akzeptormolekül-Anregungswellenlänge ermittelt wird.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass der Bereich (16, 17, 27, 28) oder die Bereiche (16, 17; 27, 18) über einen Rechner und vorzugsweise eine Computermouse (31) markiert werden.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass das Zuordnen individueller Beleuchtungslichtstrahl-Wellenlängen und/oder Beleuchtungslichtstrahl-Leistungen zu dem Bereich (16, 17; 27, 28) oder den Bereichen (16, 17; 27, 28) über den Rechner erfolgt.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass zur Vermeidung des Beleuchtens der Probe (11) außerhalb des Bereichs (24, 25) oder der Bereiche (24, 25) ein vorgebbares Blan-

king durchgeführt wird.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass der Bereich (24, 25) oder die Bereiche (24, 25) im Vergleich zur verbleibenden Probe (11) langsamer und mit erhöhter Photonenstatistik abgetastet werden.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Probe (11) außerhalb des Bereichs (24, 25) oder der Bereiche (24, 25) oder zwischen den Bereichen (24, 25) mit maximaler Ablenkgeschwindigkeit abgetastet wird.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Strahlablenkung außerhalb des Bereichs (24, 25) oder der Bereiche (24, 25) oder zwischen den Bereichen (24, 25) von der sinus-, sägezahn- oder mäanderförmigen Strahlablenkung abweicht.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Strahlablenkung zwischen zwei oder den Bereichen (24, 25) im Wesentlichen in direkter Linie von einem Bereich (24, 25) zu einem anderen Bereich (25, 24) erfolgt.

14. Konfokales Scan-Mikroskop, insbesondere zur Durchführung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 13, mit mindestens einer Lichtquelle (1), vorzugsweise einem Laser, zur Erzeugung eines Beleuchtungslichtstrahls (4) für eine Probe (11) und einer Strahlablenkeinrichtung (9) zur Führung des Beleuchtungslichtstrahls (4) über die Probe (11), gekennzeichnet durch Mittel zum Aufnehmen eines Voransichtsbilds (19, 30) und Mittel zum Markieren mindestens eines interessierenden Bereichs (16, 17; 27, 28) im Voransichtsbild (19, 30), wobei dem Bereich (16, 17; 27, 28) oder den Bereichen (16, 17; 27, 28) individuelle Beleuchtungslichtstrahl-Wellenlängen und/oder Beleuchtungslichtstrahl-Leistungen zuordenbar und der Bereich (24, 25) oder die Bereiche (24, 25) der Probe (11) gemäß der Zuordnung beleuchtbar sind.

15. Konfokales Scan-Mikroskop nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass ein spektral selektives Element zur Einstellung der Beleuchtungslichtstrahl-Wellenlänge oder -Wellenlängen vorgesehen ist.

16. Konfokales Scan-Mikroskop nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass das spektral selektive Element ein AOTF (5), ein AOD, ein EOM oder ein mechanisches Bauteil ist.

17. Konfokales Scan-Mikroskop nach Anspruch 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, dass das spektral selektive Element über einen Rechner (13), vorzugsweise in Abhängigkeit von der Ablenkposition, steuerbar ist.

18. Konfokales Scan-Mikroskop nach einem der Ansprüche 14 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass ein Element zur Einstellung der Beleuchtungslichtstrahl-Leistung vorgesehen ist.

19. Konfokales Scan-Mikroskop nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass das Element einen AOTF (5) oder ein mechanisches Bauteil aufweist.

20. Konfokales Scan-Mikroskop nach Anspruch 18 oder 19, dadurch gekennzeichnet, dass das Element über einen Rechner (13), vorzugsweise in Abhängigkeit von der Ablenkposition, steuerbar ist.

21. Konfokales Scan-Mikroskop nach einem der Ansprüche 18 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass das selbe Element zur Einstellung der Beleuchtungslichtstrahl-Wellenlänge oder -Wellenlängen und zur Einstellung der Beleuchtungslichtstrahl-Leistung verwendbar ist.

22. Konfokales Scan-Mikroskop nach einem der An-

sprüche 14 bis 21, dadurch gekennzeichnet, dass mehrere Laser (2) zur Erzeugung des Beleuchtungslichtstrahls (4) vorgesehen sind.

23. Konfokales Scan-Mikroskop nach einem der Ansprüche 14 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass ein oder mehrere Mehrlinienlaser zur Erzeugung des Beleuchtungslichtstrahls (4) vorgesehen sind. 5

24. Konfokales Scan-Mikroskop nach einem der Ansprüche 14 bis 23, dadurch gekennzeichnet, dass zur Darstellung und Markierung des Bereichs (16, 17; 27, 28) oder der Bereiche (16, 17; 27, 28) ein PC (14) verwendbar ist, auf dessen Monitor (15) das Bild oder Vorsichtsbild (19, 30) der Probe (11) angezeigt wird. 10

25. Konfokales Scan-Mikroskop nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, dass die Markierung eines dreidimensionalen Bereichs oder dreidimensionaler Bereiche in einer x,y,z-Darstellung oder in zweidimensionalen Schnittdarstellungen durchführbar ist. 15

26. Konfokales Scan-Mikroskop nach einem der Ansprüche 14 bis 25, dadurch gekennzeichnet, dass die Strahlablenkeinrichtung (9) Galvanometerstellenelemente aufweist. 20

27. Konfokales Scan-Mikroskop nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass die Galvanometerstellenelemente vorzugsweise mit Hilfe eines Rechners (13) steuerbar sind, mit dem die Strahlablenk-Geschwindigkeiten individuell an Erfordernisse bezüglich des markierten Bereichs oder der markierten Bereiche anpassbar sind. 25

30

Hierzu 5 Seite(n) Zeichnungen

35

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -

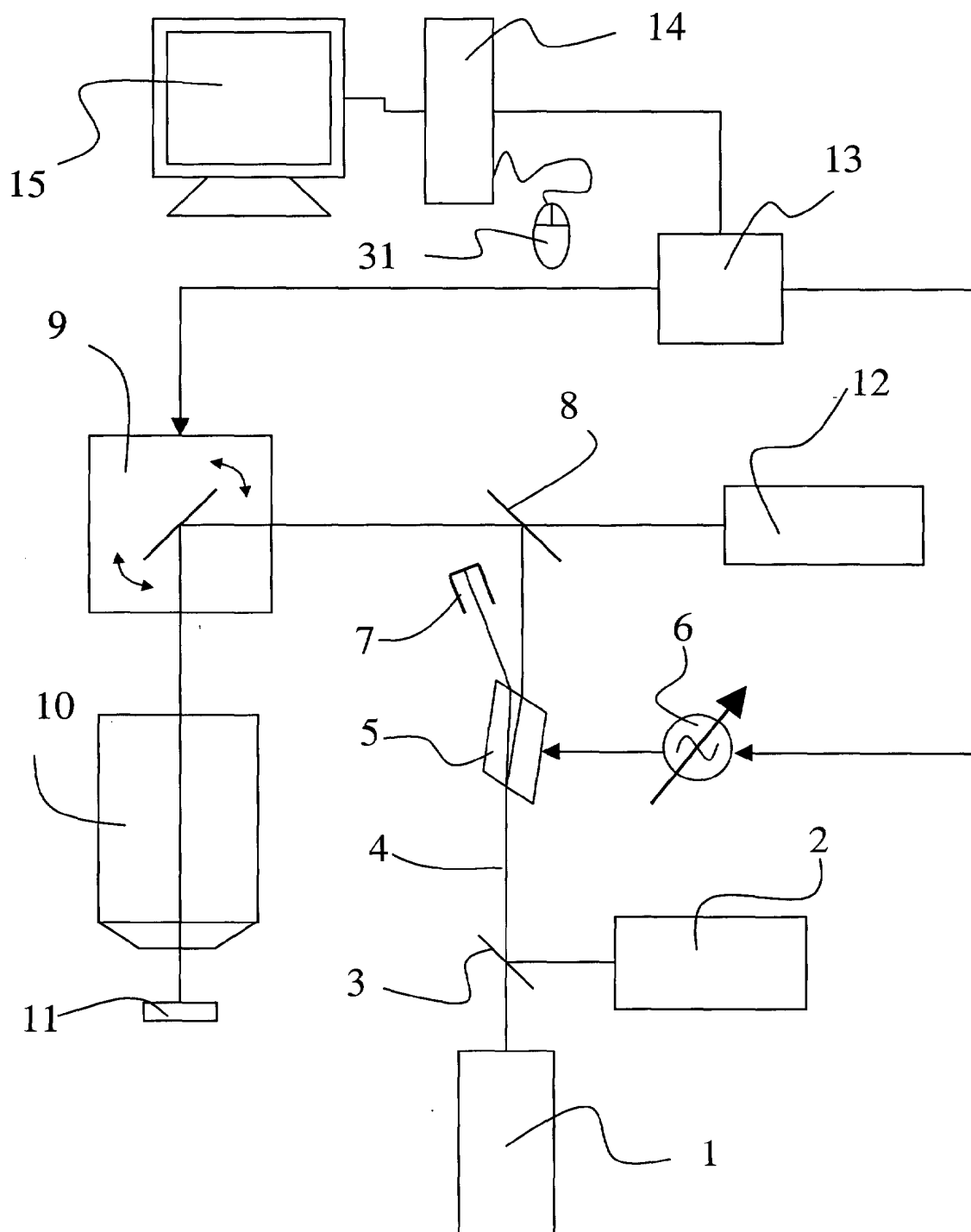
Fig. 1:

Fig. 2:

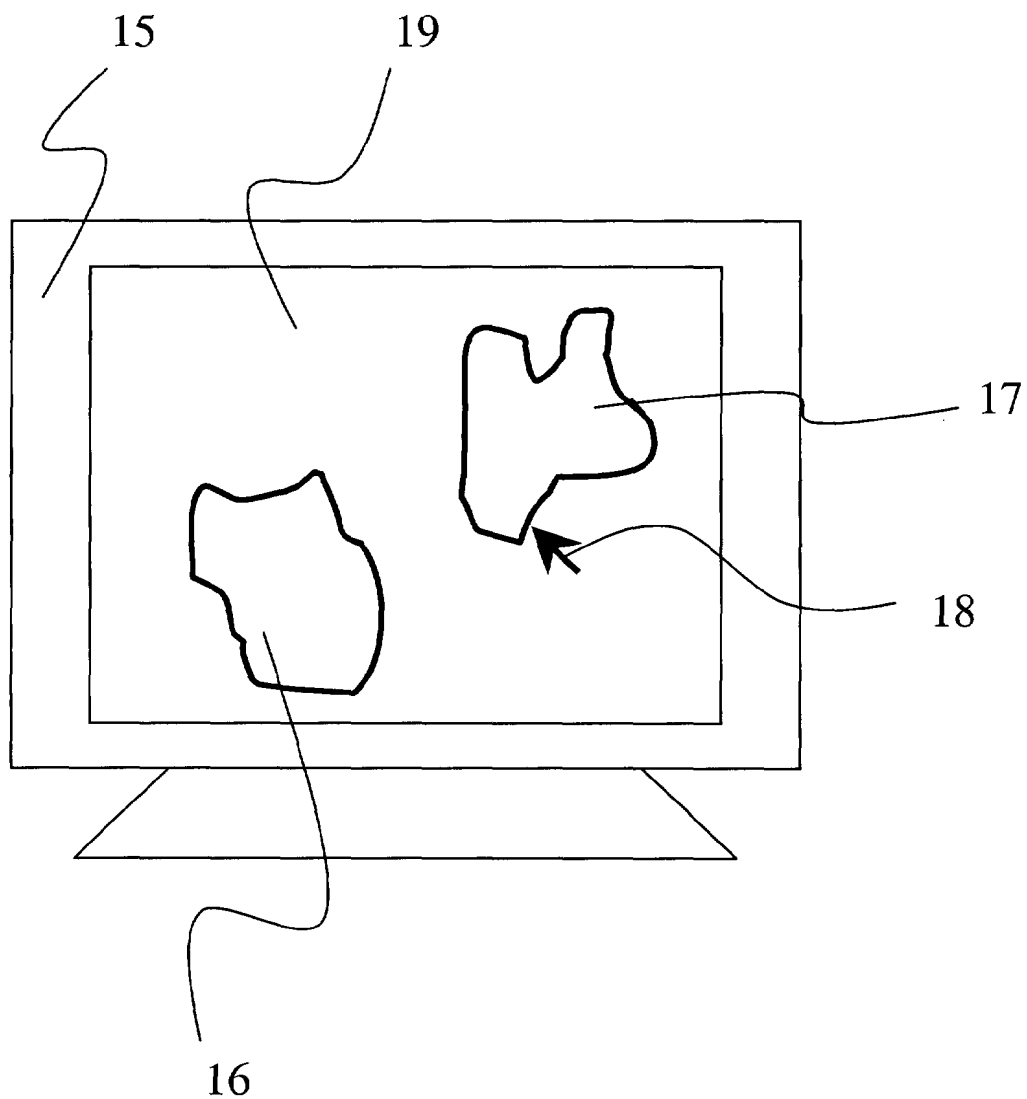


Fig. 3:

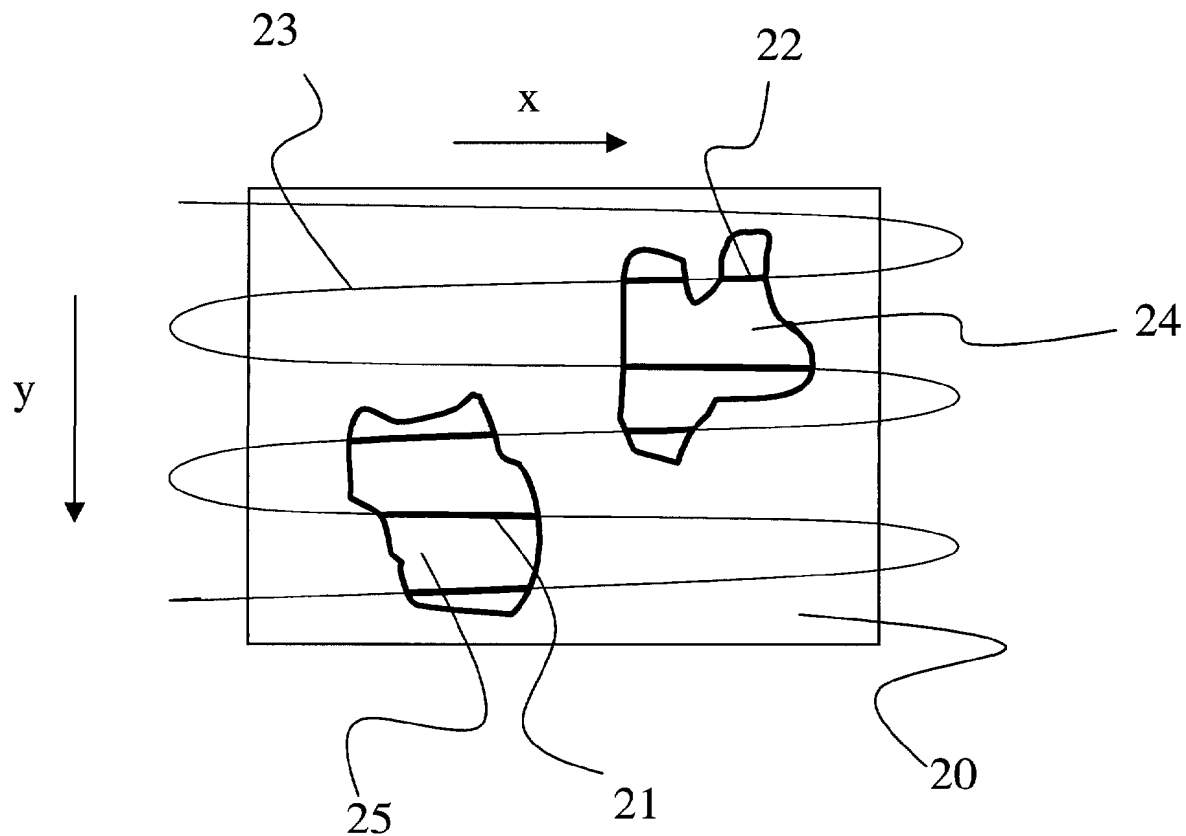


Fig. 4:

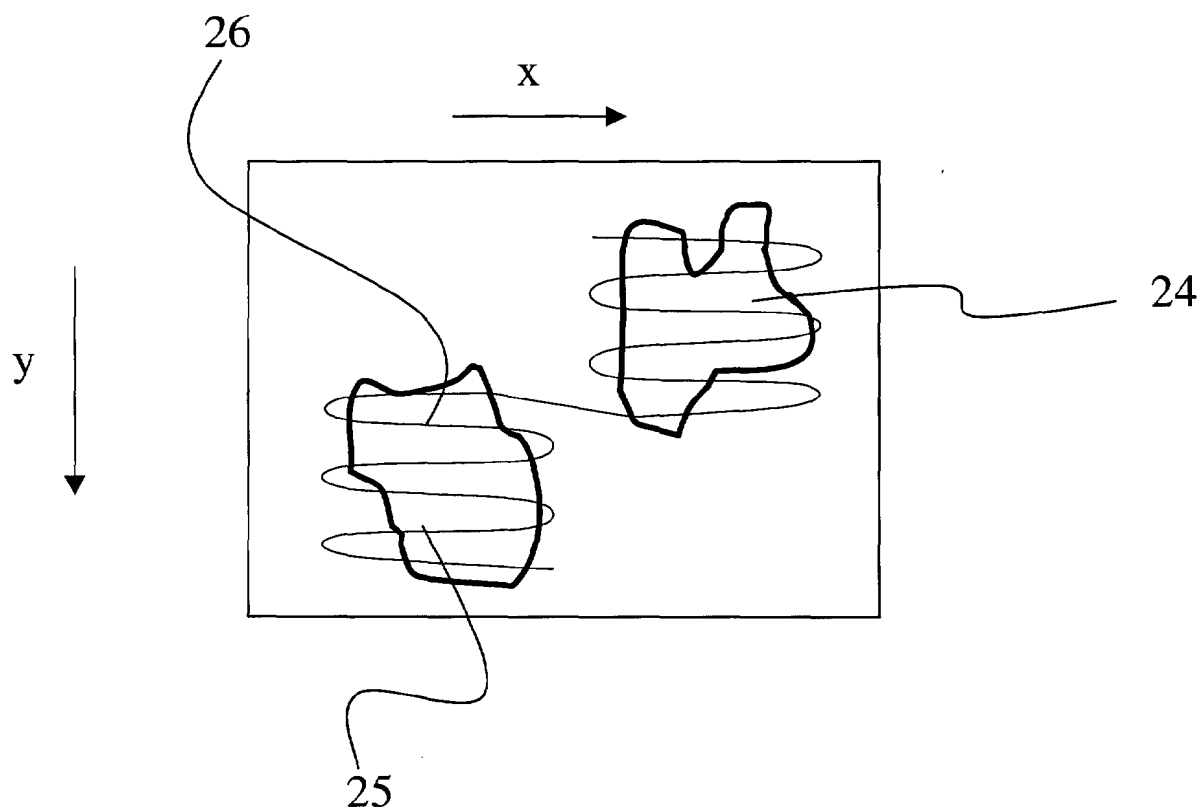


Fig. 5: